

Abstract of French Patent Application 86 01985

Publication No. 2 594 229

(54) Title: New Lav-II type of retrovirus susceptible of causing AIDS, antigens obtained from this retrovirus and corresponding antibodies, and their application to the diagnosis of AIDS.

(57) The invention concerns a new type of retrovirus called LAV-II, a sample of which has been filed at the CNCM under the number 1-502. It also concerns antigens susceptible of being obtained from this virus, in particular proteins p12 and p16. These different antigens can be applied to the diagnosis of the disease, particularly by coming in contact with a serum of the patient on whom the diagnosis must be performed. Lastly, it concerns immunogenic compositions that contain, more specifically, at least one of the two proteins p12 and p16.

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 594 229

②1 N° d'enregistrement national :

86 01985

⑤1 Int Cl⁴ : G 01 N 33/569, 33/577; A 61 K 39/21 // C 12 N
7/00; C 12 P 21/00.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 13 février 1986.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 33 du 14 août 1987.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *INSTITUT PASTEUR, Etablissement pu-
blic et CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTI-
FIQUE, Etablissement public. — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Luc Montagnier, Solange Chamaret, De-
nise Guétard, Marc Alizon, François Clavel et Françoise
Brun-Vezinet.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : S.C. Ernest Gutmann, Yves Plasseraud.

⑤4 Nouveau rétrovirus du type Lav-II susceptible de provoquer le SIDA, antigènes obtenus à partir de ce rétrovirus et anticorps correspondants et leurs applications au diagnostic du SIDA.

⑤7 L'invention concerne une nouvelle variété de rétrovirus
dénommés LAV-II, dont un échantillon a été déposé à la
CNCM sous le n° I-502. Elle concerne aussi les antigènes
susceptibles d'être obtenus à partir de ce virus, en particulier
des protéines p12 et p18. Ces différents antigènes sont
applicables au diagnostic de la maladie, notamment par mise
en contact avec un sérum du malade chez lequel le diagnostic
doit être effectué. Elle concerne enfin des compositions immu-
nogènes contenant plus particulièrement l'une au moins des
deux protéines p12 et p18.

FR 2 594 229 - A1

Nouveau rétrovirus du type LAV-II susceptible de provoquer le SIDA, antigènes obtenus à partir de ce rétrovirus et anticorps correspondants et leurs applications au diagnostic du SIDA.

5

L'invention est relative à une forme nouvelle de virus, ayant la capacité de provoquer des lymphadénopathies susceptibles d'être relayées ensuite par le syndrome d'immuno-déficience acquise (SIDA). L'invention concerne également des antigènes susceptibles d'être obtenus à partir de ce virus ou ayant avec celui-ci des propriétés en commun. Elle concerne également les anticorps susceptibles d'être provoqués contre ces divers antigènes. Enfin l'invention concerne des applications de ces antigènes ou anticorps au diagnostic de certaines formes du SIDA et, en ce qui concerne certains d'entre eux, à la production de compositions immunogènes et de compositions vaccinales contre ce rétrovirus.

L'isolement d'un premier rétrovirus, dont avait été reconnue la responsabilité dans le développement du SIDA, a fait l'objet d'une description dans un article de F. BARRE-SINOUSSE et al dès 1983 (Science, vol. 220, n° 45-99, 20, p. 868-871). L'application au diagnostic de la présence d'anticorps contre le virus de certains extraits de ce dernier, et plus particulièrement de certaines de ses protéines, a été plus spécialement décrite dans la demande de brevet européen n° 138.667. Ce rétrovirus est connu sous la désignation LAV. Depuis d'autres souches similaires et des variants du LAV ont été isolés. On rappellera pour mémoire ceux connus sous les désignations HTLV-III et ARV. L'expression "LAV-I" couvre aussi l'ensemble de ces désignations et les souches virales correspondantes. L'ensemble des virus identiques ou proches de l'isolat initial "LAV" sera appelé dans le présent texte "LAV type I" ou "LAV-I". Le nouveau rétrovirus faisant l'objet du présent brevet et les souches de virus qui en

sont proches, sont appelés "LAV type II" ou "LAV-II". Chaque isolat est suivi des trois premières lettres du nom du malade dont il a été isolé. On peut définir l'ensemble "LAV" comme un ensemble de virus causant soit des poly-
5 adénopathies généralisées et persistentes, soit un SIDA et ayant in vitro un tropisme pour les cellules T4 chez lesquelles le rétrovirus induit un effet cytopathogène. Ces rétrovirus se sont révélés distincts des autres rétrovirus humains déjà connus (HTLV-I et HTLV-II).

10 Bien qu'il y ait une assez grande variabilité génétique du virus, les différentes souches isolées à ce jour à partir des malades américains, européens, haïtiens et africains ont en commun des sites antigéniques conservés sur leurs principales protéines : protéine du noyau (core) p25
15 et glycoprotéine d'enveloppe gp110 et protéine transmembranaire gp41-43. Ceci permet à la souche prototype LAV-I déposée à la CNCM sous le n° I-232 d'être utilisée comme souche d'antigènes pour la détection d'anticorps chez tous les types de malades, quelle que soit leur origine. Cette
20 souche, dont le virus HTLV-III isolé par R.C. GALLO et coll. ne peut être distingué, est donc utilisée actuellement pour la détection d'anticorps chez les donneurs de sang et les malades par ELISA, Immunofluorescence, les techniques dites de "Western Blot" (ou immuno-empreintes)
25 et "RIPA" (Radio-Immunoprecipitation Assay).

Cependant dans une étude sérologique effectuée sur des malades natifs de Guinée-Bissau et hospitalisés au Portugal, il a été observé que certains donnaient des réactions séro-négatives ou très faiblement positives par
30 ces tests mettant en oeuvre un lysat du LAV-I, alors qu'ils présentaient les signes cliniques et immunologiques du SIDA.

A partir des lymphocytes mis en culture de l'un de ces malades, il a été isolé un rétrovirus dont la structure
35 en microscopie électronique et le profil des

protéines en gel d'électrophorèse SDS d'une manière générale, les propriétés sont similaires au LAV-I, mais qui présente une moindre parenté, si ce n'est une parenté faible avec celui-ci, tant du point de vue de l'homologie antigénique de ses protéines que de l'homologie de son matériel génétique.

Ce nouveau rétrovirus, ci-après appelé LAV-II, ou des rétrovirus ayant des propriétés antigéniques et immunologiques équivalentes, peuvent donc constituer des sources d'antigènes pour le diagnostic de l'infection par ce virus et des variants induisant notamment un SIDA, en particulier chez les malades africains ou les personnes ayant séjourné en Afrique.

Ce virus a été isolé de plusieurs malades de Guinée-Bissau et des Iles du Cap Vert, et en particulier à partir du sang, prélevé sous héparine, d'un malade de 28 ans, originaire de la Guinée-Bissau, hétérosexuel, qui n'avait jamais été ni transfusé, ni toxicomane. Il présentait depuis 1983 une importante diarrhée chronique, un amaigrissement important (17 kg) avec de la fièvre par intermittence. Récemment il a présenté des infections à Candida et Serratia, dont une candidose oesophagienne, typique du SIDA.

Il présentait également une anémie, une lymphopénie, un rapport lymphocytes T4/lymphocytes T8 de 0,15, et une anergie cutanée. Ses lymphocytes en culture ne répondaient pas à la stimulation par la phyto-hémagglutinine et la concanavaline A. Il s'agissait finalement d'un SIDA.

L'ensemble de ces signes témoignait des symptômes "complexes liés au SIDA" ou "ARC" (abréviation anglaise de "AIDS Related Complex"), du type de ceux causés par le virus LAV-I.

La mise en culture des lymphocytes de ces malades et l'isolement du rétrovirus ont été effectués selon la technique déjà décrite pour l'isolement du LAV-I (1) dans

l'article de BARRE-SINOUSSE et Coll. et la demande de brevet européen n° 84 401834/O 138 667. On les rappelle brièvement ci-après : stimulation des lymphocytes pendant 3 jours par la phytohémagglutinine (PHA). Les lymphocytes 5 ont été cultivés en milieu de culture RPM1-16-40 additionné de 10 % de sérum de veau foetal. 10^{-5} M Beta mercaptoéthanol, d'interleukine 2 et de sérum anti-interféron α humain.

La production de virus a été suivie par son activité transcriptase inverse. Dans le surnageant de culture, 10 le pic d'activité virale est apparu entre le 14ème et le 22ème jour, puis a décliné, suivi par le déclin et la mort de la culture cellulaire.

Le virus a ensuite été propagé sur des cultures de 15 lymphocytes de donneurs de sang, puis sur des lignées continues d'origine leucémique, telles que HUT 78. Il a été caractérisé comme étant relativement distinct du LAV-I par ses protéines, et son acide nucléique. Le virus a été purifié comme décrit dans les documents antérieurs déjà mentionnés. 20 Il a été déposé à la "Collection Nationale des Cultures de Micro-organismes" (CNCM) à l'INSTITUT PASTEUR, le 19 décembre 1985, sous le n° CNCM I-502. D'une façon générale l'invention concerne tout virus équivalent contenant des protéines de structure qui présentent les mêmes propriétés immunologiques que celles du virus LAV-II déposé 25 à la CNCM sous le numéro I-502. Quelques caractéristiques de ces protéines constitutives et de ses acides nucléiques, telles qu'elles résultent des essais réalisés dans les conditions qui suivent, sont indiquées ci-après.

30 1) Protéines : le virus a été marqué métaboliquement par la ^{35}S cystéine et la ^{35}S méthionine, les cellules infectées étant incubées en présence de ces acides aminés radioactifs en milieu de culture dépourvu de l'acide aminé non marqué correspondant, pour une période de 35 14 à 16 heures. Le surnageant est ensuite clarifié, puis

le virus ultracentrifugé une heure à 100 000 g sur un coussin de 20 % de saccharose. Les principales protéines du virus sont séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide (12,5 %) dans des conditions dénaturantes (SDS) ou dans un gel de polyacrylamide (10 %) + bis acrylamide (0,13 %) avec SDS (0,1 % en concentration finale). On utilise comme poids moléculaire de référence les marqueurs colorés suivants commercialisés par la société

BRL :

10	myosine :	200 Kd
	phosphorylase B :	97,4 Kd
	BSA :	68 Kd
	ovalbumine :	43 Kd
	α chymotrypsine :	25,7 Kd
15	β lactoglobuline :	18,4 Kd
	lysozyme :	14,3 Kd

Elles sont encore mieux distinguées après immunoprécipitation (RIPA) ou par immunoempreintes (Western blot) en utilisant les anticorps présents dans le sérum du malade :

20 leur poids moléculaire déterminé par leur migration apparente est très proche sinon identique à celles du LAV-I : p12, p16 (mesures refaites pour ces deux protéines dans des conditions de plus grande précision qu'antérieurement), p25 pour les protéines internes, gp160 (poids moléculaire de 160 Kd \pm 10 %) pour le précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe gp36 (poids moléculaire de 36 Kd \pm 5 %), pour la protéine transmembranaire (mise en évidence en particulier par la technique du Western blot). Cependant, ces protéines, dans les systèmes de détection

30 utilisés au laboratoire ou par utilisation des tests commercialisés par Diagnostics Pasteur sous la marque "ELAVIA" par exemple, ont été peu ou pas reconnues par des sérums de malades anti-LAV-I. Seule la protéine p25 a été faiblement immunoprécipitée par de tels sérums. La protéine d'enveloppe ne l'a pas été. Le sérum du malade infecté

35

par le nouveau virus (LAV-II) reconnaît faiblement une protéine p34 du LAV-I. Dans le système de détection utilisé, les autres protéines du LAV-I n'ont pas été reconnues.

2) Acide nucléique : l'ARN du virus, déposé sur
5 filtre d'après la technique du "spot blot" n'a pas hybridé, dans des conditions stringentes avec l'ADN du LAV-I. Par "conditions stringentes" on entend : les conditions dans lesquelles la réaction d'hybridation est faite en mettant le RNA du LAV-II en contact avec la sonde choisie
10 marquée radioactivement au p^{32} (ou marqué de façon différente), à savoir à 42°C en présence de 50 % de formamide pendant 18 heures. La membrane sur laquelle a été faite la réaction d'hybridation est lavée ensuite à 65°C dans un tampon contenant 0,1 % de SDS et 0,1 X SSC.

15 Par conditions non stringentes, on entend les conditions dans lesquelles la réaction d'hybridation est faite en mettant en contact avec la sonde choisie marquée au p^{32} (ou marquée autrement), à savoir à 42°C en présence de 30 % de formamide pendant 18 heures. Le lavage de la
20 membrane est réalisé à 45°C avec un tampon contenant 0,1 % de SDS et 2 X SSC.

On a également réalisé des essais d'hybridation avec une sonde d'hybridation constituée par un plasmide recombinant pBT1 obtenu par clonage de l'ADN du LAV-I
25 provenant de AJ19 (Cell 1985, vol. 40, p.9) dans le vecteur pUC18. En conditions non stringentes, seule une très faible hybridation a été observée.

D'autres sondes ont été utilisées :

a) Des sondes simple brin de l'ADN du LAV-I sub-
30 génomique élaborées à partir de sous-clones du génome du LAV-I mis dans le phage M13. Les régions clonées concernaient le gène protéase ou le gène "endonucléase".

Seule une sonde de la région endonucléase de LAV-I (séquence de nucléotides comprise entre les bases n° 3760
35 et 4130) a donné une hybridation faible en conditions non

stringentes avec le LAV-II. La sonde "protéase" (séquence de nucléotides de LAV-I comprise entre les bases n° 1680 et 1804) n'a pas hybridé même en conditions non stringentes avec le LAV-II.

- 5 b) Une sonde pRS3 constituée par la séquence codant pour la région "enveloppe" du LAV-I (sous-clonage dans pUC18) n'a pas donné d'hybridation en conditions non stringentes avec LAV-II.

10 La technique du "spot blot" est appelée aussi "dot blot" (transfert par taches).

 Le virus LAV-II s'est avéré utilisable comme source d'antigènes pour la détection d'anticorps chez d'autres malades africains. Les différents antigènes de LAV-II ont été reconnus par des sérums provenant d'autres
15 malades de Guinée-Bissau atteints d'ARC, ou de personnes asymptomatiques dont les anticorps immunoprécipitent les protéines du LAV-II..

 Le LAV-II, tout comme le LAV-I, a un tropisme pour les lymphocytes T4 humains et est cytotoxique à leur
20 égard. Il n'a pas de parenté antigénique avec les HTLV-I et HTLV-II. En particulier, les protéines du LAV-II ne donnent pas lieu à des réactions immunologiques croisées avec les protéines p19 et p24 des HTLV-I et HTLV-II, notamment dans les techniques de radio-immunoprécipitation
25 ou RIPA (abréviation de l'expression anglaise "Radio-immunoprécipitation-assay").

 D'une façon générale, l'invention concerne toute composition contenant au moins l'une des protéines de LAV-II, cette composition pouvant être appliquée au diag-
30 nostic de la variété correspondante du SIDA, en mettant en oeuvre les techniques de diagnostic, telles que décrites dans la demande de brevet européen citée ci-dessus. A cet égard, l'invention concerne plus particulièrement des compositions contenant les protéines p12, p16, p25, s'agis-
35 sant des protéines internes, ou les glycoprotéines gp36 ou

gp160. Des compositions avantageuses contiennent l'ensemble des protéines du LAV-II ou plusieurs de ces protéines et/ou glycoprotéines. On mentionnera à titre d'exemples de compositions, celles qui contiennent simultanément :

- 5 - la p25 et la gp36,
- la p25, les gp36 et gp160,
- les p12, p16 et p25,
- les p16, p25 et gp 160

L'invention concerne encore chacune de ces protéines à l'état purifié, en ce sens que chacune de ces protéines ne conduit qu'à une bande unique en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, notamment dans les conditions expérimentales qui ont été indiquées plus haut. Tout procédé approprié de séparation et/ou de purification pour obtenir chacune d'entre elles peut être utilisé. On mentionnera à titre d'exemple de technique pouvant être mise en oeuvre celle décrite par R.C. MONTELARO et Coll., J. of Virology, juin 1982, pp. 1029-1038.

Il va de soi que ces compositions n'ont que valeur d'exemples. En particulier, l'invention concerne les extraits ou lysats viraux contenant l'ensemble de ces protéines et/ou glycoprotéines.

Il doit cependant être entendu que l'expression "compositions contenant une protéine ou glycoprotéine de ce virus", ne doit pas être entendue comme limitée aux extraits ou lysats du virus LAV-II.

L'invention concerne encore des compositions associant des protéines et/ou glycoprotéines d'un LAV-II, avec des protéines et/ou glycoprotéines d'un LAV-I, par exemple :

- 30 - soit les p25 d'un LAV-I et d'un LAV-II,
- soit la p18 d'un LAV-I et la p16 d'un LAV-II,
- soit des glycoprotéines d'enveloppe d'un LAV-I et des glycoprotéines d'enveloppe d'un LAV-II,
- 35 - soit naturellement des mélanges de protéines

et/ou glycoprotéines d'un LAV-I et de protéines et/ou glycoprotéines d'un LAV-II.

De telles compositions, utilisées pour le diagnostic, permettent par conséquent des opérations de diagnostic du SIDA ou des symptômes qui lui sont associés, qui s'étendent sur un plus large spectre des agents étiologiques responsables. Il va sans dire que l'utilisation pour les opérations de diagnostic de compositions qui ne contiennent que des protéines et/ou glycoprotéines de LAV-II n'en reste pas moins utile pour des diagnostics plus sélectifs de la catégorie de rétrovirus qui peut être tenue pour responsable de la maladie.

D'une façon générale, l'invention concerne toutes compositions de ce type contenant une protéine, glycoprotéine ou polypeptide ayant des propriétés immunologiques équivalentes à celles du LAV-II. Deux protéines sont dites "équivalentes" dans le cadre de cet exposé, dès lors qu'elles sont reconnues par les mêmes anticorps, notamment d'anticorps isolables à partir d'un sérum obtenu à partir d'un patient ayant fait une infection avec un LAV-II.

Parmi les polypeptides, protéines ou glycoprotéines équivalents, doivent être rangés les produits d'expression de séquences correspondantes des ADNs codant pour les séquences polypeptidiques correspondantes.

L'invention concerne encore les ADNs ou fragments d'ADNs, plus particulièrement ADNs et fragments d'ADNs clonés obtenus à partir de l'ARN ou de cADNs dérivés de l'ARN du rétrovirus LAV-II. L'invention concerne encore particulièrement tous ADNs équivalents, notamment tout ADN présentant des homologies de séquences avec l'ADN du LAV-II au moins égales à 90 %. D'une façon générale, on dira encore que l'invention concerne tout ADN (ou ARN) équivalent capable d'hybrider avec l'ADN ou l'ARN du LAV-II dans la technique du "spot blot" dans des conditions non stringentes telles que définies ci-dessus.

L'invention concerne de la même façon les sérums susceptibles d'être produits chez l'animal par inoculation à celui-ci de LAV-II. L'invention concerne donc plus particulièrement les anticorps polyclonaux plus spécifiquement orientés contre chacune des protéines ou glycoprotéines du virus. Elle concerne aussi les anticorps monoclonaux qui peuvent être produits par des techniques classiques, ces anticorps monoclonaux étant orientés plus spécifiquement contre les différentes protéines du LAV-II.

Ces anticorps polyclonaux ou monoclonaux sont utilisables dans différentes applications. On mentionnera essentiellement leur utilisation pour neutraliser les protéines correspondantes, voir inhiber l'infectivité du virus entier. Ils peuvent également être utilisés, par exemple, pour mettre en évidence des antigènes viraux dans les préparations biologiques ou pour réaliser des opérations de purification des protéines et/ou glycoprotéines correspondantes, par exemple par leur utilisation dans des colonnes de chromatographie d'affinité.

Il est entendu que, d'une façon générale, la littérature technique disponible en ce qui concerne le LAV-I et le virus dénommé HTLV-III doit être considérée comme faisant partie de la présente invention, dès lors que les techniques décrites par cette littérature s'appliquent dans des conditions semblables à l'isolement du virus LAV-II ou de virus équivalents, à l'obtention à partir de ces virus de leurs différents constituants (notamment protéines, glycoprotéines, polypeptides, acides nucléiques). On peut également faire appel aux enseignements de cette littérature technique pour ce qui est de l'application des différents constituants concernés, notamment à des opérations de diagnostic des formes correspondantes de SLA ou de SIDA.

L'invention concerne également tout virus équivalent présentant des caractéristiques immunologiques

propres au LAV-II. D'une façon générale, l'invention concerne tout virus qui, outre les propriétés que possède le LAV-II déposé à la CNCM, présente encore les caractéristiques suivantes.

5 La cible préférentielle du rétrovirus LAV-II est constituée par les cellules Leu 3 (ou lymphocytes T4). Il a une activité de transcriptase inverse nécessitant la présence d'ions Mg^{2+} et présentant une forte activité pour le poly(adénylate-oligodéoxy-thymidylase) (poly(A)-oligo-
10 (dT) 12-18). Il a une densité de 1,16 dans un gradient de sucrose. Il a un diamètre moyen de 140 nanomètres et un noyau ayant un diamètre moyen de 41 nanomètres. Les lysats de ce virus contiennent une protéine p25 qui ne croise pas immunologiquement avec la protéine p24 du virus HTLV-I ou
15 du virus HTLV-II. Il contient une protéine p16 qui n'est pas reconnue immunologiquement par la protéine p19 de HTLV-I ou de HTLV-II. Il est cytotoxique pour les lymphocytes T4 humains. Il peut être cultivé dans des lignées permanentes du type HUT ou exprimant la protéine T4.

20 L'invention concerne encore un procédé de production du virus LAV-II dans des lignées cellulaires permanentes dérivées de lymphocytes T4, par exemple du type cellules HUT 78 (lignée déposée à la CNCM sous le n° I-519 le 6 février 1986), ce procédé consistant à cultiver
25 ces lignées préalablement infectées avec le virus LAV-II, et à récupérer les quantités de virus libérées dans le milieu de culture. L'infection préalable peut notamment être réalisée comme suit :

 Les cellules HUT 78 (10^6 /ml) sont mises en cocul-
30 tures avec des lymphocytes humains normaux infectés (10^6 /ml). Le milieu de culture est du RPMI 1640 avec 10 % de sérum de veau foetal. Au bout de 15 à 21 jours, on observe un effet cytopathogène des cellules HUT 78. On dose la reverse transcriptase une semaine après cette observation,
35 dans le surnageant de culture.

La présente invention concerne plus particulièrement un procédé de diagnostic in vitro du SIDA, qui comprend la mise en contact d'un sérum ou d'un autre milieu biologique provenant d'un malade faisant l'objet du diagnostic avec une composition contenant l'une au moins des protéines ou glycoprotéines du LAV-II, ou encore un extrait ou lysat du virus, et la détection de la réaction immunologique.

Des méthodes préférées mettent en jeu par exemple des réactions immunoenzymatiques de type ELISA ou d'immunofluorescence. Les titrages peuvent être des mesures par immunofluorescence directe ou indirecte ou des dosages immunoenzymatiques directs ou indirects.

Ainsi la présente invention est également relative à des extraits de virus (soit d'un extrait d'un ou plusieurs LAV-II seulement, soit d'un mélange d'extraits originaires d'un ou plusieurs LAV-II, d'une part, et d'un ou plusieurs LAV-I, d'autre part), ces extraits étant marqués. On peut utiliser tout type de marqueur approprié : enzymatique, fluorescent, radioactif, etc..

De tels titrages comprennent par exemple :

- le dépôt de quantités déterminées de l'extrait ou des compositions visées conformes à la présente invention dans les puits d'une microplaque de titrage ;
- 25 - l'introduction dans ces puits de dilutions croissantes du sérum à diagnostiquer ;
- l'incubation de la microplaque ;
- le lavage soigneux de la microplaque avec un tampon approprié ;
- 30 - l'introduction dans les puits de la microplaque d'anticorps marqués spécifiques d'immunoglobulines humaines, le marquage étant réalisé par une enzyme choisie parmi celles qui sont capables d'hydrolyser un substrat de telle sorte que ce dernier subit alors une modification de son absorption des radiations, au moins dans une bande de longueurs
- 35

d'ondes déterminée et

- la détection, de préférence de façon comparative par rapport à un témoin, de l'importance de l'hydrolyse du substrat en tant que mesure des risques potentiels ou de la présence effective de la maladie.

La présente invention est également relative à des nécessaires ou "kits" pour le diagnostic ci-dessus, lesquels comprennent :

- un extrait ou une fraction plus purifiée des types de virus indiqués ci-dessus, cet extrait ou fraction étant marqué, par exemple de façon radioactive, enzymatique ou immunofluorescence ;
- des anti-immunoglobulines humaines ou une protéine A (fixée de façon avantageuse sur un support insoluble dans l'eau, tel que des billes d'agarose) ;
- un extrait de lymphocytes obtenus à partir d'une personne en bonne santé ;
- des tampons et, le cas échéant, des substrats pour la visualisation du marquage.

- L'invention concerne naturellement aussi l'utilisation des cADNs ou de leurs fragments (ou de recombinants les contenant) en tant que sondes, pour le diagnostic de la présence ou non de virus LAV-II dans des échantillons de sérums ou d'autres liquides ou tissus biologiques obtenus à partir de patients suspectés d'être porteurs du virus LAV-II. Ces sondes sont de préférence marquées également (marqueurs radio-actifs, enzymatiques, fluorescents, etc.). La détection peut être réalisée de toutes façons en soi connues, notamment par une mise en contact de ces sondes soit avec les acides nucléiques obtenus à partir des cellules contenues dans ces sérums ou autres milieux biologiques, soit avec ces milieux eux-mêmes dès lors que leurs acides nucléiques auront été rendus accessibles à l'hybridation avec ces sondes, et ce dans des conditions permettant l'hybridation entre ces

sondes et ces acides nucléiques et par une détection de l'hybridation éventuellement produite. Le susdit diagnostic mettant en jeu des réactions d'hybridation peut également être réalisé à l'aide de mélanges de sondes respectivement originaires d'un LAV-I et d'un LAV-II, dès lors qu'il n'est pas nécessaire de faire une différence entre le type de virus LAV recherché.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés.

L'invention concerne enfin une composition immunogène contenant une protéine du virus décrit dans la présente demande et contenant une protéine du noyau (core), telle la p12 ou la p16 de ce virus, dosée en antigène de façon à permettre l'administration d'une dose de 10 à 500, notamment de 50 à 100 microgrammes par kilogramme.

Il est encore précisé que dans les nombres qui suivent les indications "p" et/ou "gp" correspondent aux poids moléculaires approximatifs des protéines et/ou glycoprotéines correspondantes divisés par 1000. Par exemple la gp36 a un poids moléculaire de l'ordre de 36 000.

Il convient de noter que, dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour déterminer les poids moléculaires de protéines du LAV-II, le virus STLV-III décrit par Letvin et al. (Science 1985, vol. 230, p. 71) a une glycoprotéine transmembranaire dont le poids moléculaire est de 32 Kd et une protéine majeure du noyau (core) de 28 Kd alors que la protéine du noyau (core) du LAV-II a un poids moléculaire de 25 Kd.

REVENDEICATIONS

- 1 - Composition contenant une protéine et, le cas échéant, au moins une glycoprotéine du virus purifié LAV-II ou d'un variant de ce virus ayant sensiblement les mêmes propriétés biologiques, notamment de celui qui a été déposé à la CNCM le 19 décembre 1985, sous le numéro CNCM I-502, caractérisée en ce qu'elle contient une protéine p12 ou p16 de ce virus.
- 2 - Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle consiste en un extrait total ou lysat du susdit virus.
- 3 - Méthode pour le diagnostic in vitro de la présence d'anticorps anti-LAV-II dans un liquide biologique, et plus particulièrement de l'existence d'un SLA ou d'un SIDA, selon laquelle on met en contact un sérum ou un autre milieu biologique provenant du malade faisant l'objet du diagnostic, avec une composition selon la revendication 1 ou la revendication 9, et l'on détecte la réaction immunologique.
- 4 - Kit pour le titrage de sérums provenant de malades souffrant du SLA ou du SIDA, caractérisé en ce qu'il comprend :
- une composition telle que définie dans la revendication 1 ou la revendication 2, cette composition étant marquée ;
 - des anti-immunoglobulines humaines ;
 - un extrait de lymphocyte obtenu à partir d'une personne en bonne santé ;
 - des tampons et, le cas échéant, des substrats pour la visualisation du marquage ;
 - des moyens pour détecter le conjugué marqué résultant de la réaction immunologique entre les réactifs marqués et le sérum soumis au dosage.
- 5 - Composition immunogène contenant une protéine du noyau ("core") du virus selon la revendication 1, telle que la p12 ou la p16 de ce virus, en association avec un

véhicule pharmaceutiquement acceptable.

6 - Procédé de purification de l'une des glycoprotéines selon la revendication 1 à partir d'un extrait ou lysat de ce virus, caractérisé en ce que l'on réalise une
5 immunoprécipitation de ces protéines par un sérum de patient connu pour posséder des anticorps actifs contre ces glycoprotéines ou encore avec des anticorps monoclonaux produits par des hybridomes préalablement formés et sécrétant lesdits anticorps monoclonaux, ceux-ci reconnaissant
10 plus particulièrement la glycoprotéine recherchée.

7 - Anticorps monoclonal caractérisé par sa capacité à reconnaître spécifiquement l'une des susdites glycoprotéines.

8 - Les hybridomes sécréteurs de l'anticorps monoclonal selon la revendication 7.
15

9 - Composition immunogène selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle est dosée en antigène de façon à permettre l'administration d'une dose de 10 à 500, notamment de 50 à 100 microgrammes par kilogramme.